

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

22.07.2004

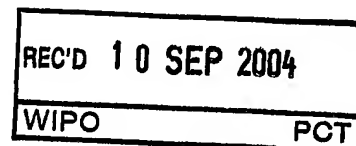
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 6月27日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-185981
[ST. 10/C]: [JP2003-185981]

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所
増田 税
株式会社北海道グリーンバイオ研究所

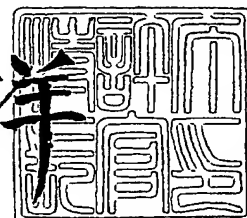


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月26日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願

【整理番号】 341H03002

【提出日】 平成15年 6月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/83
C12N 15/09
C07H 21/00

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号 独立
行政法人産業技術総合研究所 北海道センター内

【氏名】 松村 健

【発明者】

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北9条西9丁目 北海道大学大学院
農学研究科内

【氏名】 増田 税

【発明者】

【住所又は居所】 北海道夕張郡長沼町東5線北15番地 株式会社北海道
グリーンバイオ研究所内

【氏名】 一町田 紀子

【特許出願人】

【持分】 050/100

【識別番号】 301021533

【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【特許出願人】

【持分】 025/100

【住所又は居所】 北海道札幌市北区北9条西9丁目 北海道大学大学院
農学研究科内

【氏名又は名称】 増田 税

【特許出願人】

【持分】 025/100

【識別番号】 592113500

【氏名又は名称】 株式会社北海道グリーンバイオ研究所

【代理人】

【識別番号】 100102004

【弁理士】

【氏名又は名称】 須藤 政彦

【電話番号】 03-5202-7423

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 053327

【納付金額】 10,500円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【その他】 国等以外のすべての者の持分の割合

0 5 0 / 1 0 0

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 植物ウイルスベクター

【特許請求の範囲】

【請求項1】 キュウリモザイクウイルス (Cucumber mosaic virus, CMV) のRNA 2分子の2b領域の一部を欠失させ、当該配列部分に外来遺伝子導入サイトを挿入したことを特徴とする植物ウイルスベクター。

【請求項2】 CMV-Y RNA 2の感染性クローンであるpCY2の2b ORFのStuIサイトからストップコドンまでの領域を欠失させたことを特徴とする、請求項1に記載の植物ウイルスベクター。

【請求項3】 2b ORFの8番目のU (ウラシル) をA (アデニン) に変えるポイントミューテーションを導入したことを特徴とする、請求項2に記載の植物ウイルスベクター。

【請求項4】 pCY2のStuI-AvrII領域に、StuI-stop-MluI-SnaBIを含む領域を導入したことを特徴とする、請求項2に記載の植物ウイルスベクター。

【請求項5】 CMVが、CMV-Y、SSV、CMV-O、CMV-L、m2-CMV、HL-CMVに代表されるサブグループ1及びサブグループ2に属するCMV分離株である、請求項1に記載の植物ウイルスベクター。

【請求項6】 請求項4に記載の植物ウイルスベクターのStuIサイトとMluI領域に、外来遺伝子を挿入したことを特徴とする遺伝子組み換え体。

【請求項7】 請求項6に記載の遺伝子組み換え体を使用して外来遺伝子を植物に導入し、安定的に外来遺伝子を発現させることを特徴とする植物における遺伝子発現方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物RNAウイルスベクターに関するものであり、更に詳しくは、RNA 1、RNA 2、RNA 3A、及びRNA 3Bの4分節のウイルスゲノムを持つキュウリモザイクウイルス (Cucumber mosaic virus, CMV) のRNA 2分子

を改変した新規植物ウイルスベクター、及び植物における遺伝子発現方法に関するものである。

本発明は、植物の遺伝子操作及び遺伝子発現方法の分野において、約1000種類以上の植物を宿主として、これらの植物においてベクターとして利用することが可能であって、外来遺伝子を安定的に発現することができる新規植物RNAウイルスベクター、及び植物における新しい遺伝子発現方法を提供するものとして有用である。

【0002】

【従来の技術】

従来、植物RNAウイルスベクターの研究は、感染植物における増殖能が非常に高いタバコモザイクウイルス(Tobacco mosaic virus, TMV)とブロモモザイクウイルス(Bromo mosaic virus, BMV)の感染性クローンを用いて行われてきた。

そして、この分野では、ウイルス遺伝子の発現様式の違いなどから、今までに、いくつかの外来遺伝子の発現方式が開発されている。ここで、それらを紹介すると、例えば、TMVやポティウイルス属(Potyvirus)では、ウイルスCP遺伝子と外来遺伝子が融合したタンパク質を発現するベクターが開発されている(非特許文献1～2参照)。また、TMVと近縁のウイルス(Odontoglossum ringspot virus)のサブゲノミックプロモーターを導入することにより、サブゲノムを介して外来遺伝子が発現させるベクターも開発されている(非特許文献3参照)。

【0003】

ただ、これまでは、このようなウイルスベクターの開発には、主にTMVやポティウイルス属に代表される、棒状、ひも状のウイルスが使用されてきた。それは、棒状、ひも状のウイルスベクターは、球状ウイルスに比べ、挿入できる外来遺伝子の長さに物理的制限が少ないという利点があるからである。一方、球状ウイルスであるBMVにおける発現ベクターの系としては、1 a タンパク質、2 a タンパク質の複製酵素遺伝子が発現するタバコに、外来遺伝子をもつRNA 3を接種するという方法が報告されている(非特許文献4参照)。

【0004】

また、CMVにおいても、ウイルスベクターについて、いくつかの研究がなさ

れている。その一つは、complementation による 4 分節 CMV ベクターの開発である（非特許文献 5 参照）。CMV の RNA 3 には MP と CP がコードされており、ウイルスの細胞間移行には MP と CP の両方が必須である（非特許文献 5 参照）。そこで、これまでに、本発明者らは、RNA 3 分子を改変し、MP 領域を GFP 遺伝子に置換した RNA 3 A と CP 遺伝子をもたない RNA 3 B を構築し、complementation により細胞間移行するウイルスベクターを開発した。これを、RNA 1、RNA 2、RNA 3 A、及び RNA 3 B の 4 分節のウイルスゲノムを持つ CMV として、ベンタミアーナに接種したところ、接種葉の minor vein で GFP 蛍光が観察された。また、RNA 3 B で欠失させた CP 領域にマルチクローニングサイトを挿入し、そこに、GUS (bacterial- β -glucuronidase) 遺伝子や BYMV (Bean yellow mosaic virus) の CP 遺伝子を導入したところ、接種葉の minor vein において GUS 活性や BYMV-CP が検出された。しかし、この RNA 3 A、RNA 3 B が互いに homologous RNA recombination を起こし、上葉では導入遺伝子の発現は見られなかった。

【0005】

【非特許文献 1】

Sugiyama, Y., Hamamoto, H., Takemoto, S., Watanabe, Y. and Okada, Y., Systemic production of foreign peptides on the particle surface of Tobacco mosaic virus, FEBS Letters 359, 247-250 (1995)

【非特許文献 2】

Fernandez-Fernandez, M. R., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Casal, J. I. and Garcia, J. A., Development of an antigen presentation system based on plum pox potyvirus, FEBS Letters 427, 229-235 (1998)

【非特許文献 3】

Donson et al., Systemic expression of a bacterial gene by a tobacco mosaic virus-based vector, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7204-7208 (1991)

【非特許文献 4】

Mori, M., Kaido, M., Okuno, T. and Furusawa, I., mRNA amplification system by

viral replicase in transgenic plants, FEBS Lett. 336, 171-174 (1993)

【非特許文献 5】

Zhao, Y., Hammond, J. Tousignant, M. E. and Hammond, R. W., Development and evaluation of a complementation-dependent gene delivery system based on Cucumber mosaic virus, Archives of Virology 145, 2285-2295 (2000)

【非特許文献 6】

Canto, T., Prior, D. A., Hellward K. H., Oparka, K. J., Palukaitis, P., Characterization of cucumber mosaic virus. IV. Movement protein and coat protein are both essential for cell-to-cell movement of cucumber mosaic virus, Virology 237, 237-248 (1997)

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

このように、従来、CMVのウイルスベクターについては、いくつかの研究例があるが、現在までのCMVベクターの開発では、RNA 3に外来遺伝子を導入する方法がとられており、いずれも、接種上葉での増殖が認められない等の問題があり、その改善が強く求められていた。このような状況の中で、本発明者らは、上記従来技術に鑑みて、新たなウイルスベクターの開発を目的として、CMVのRNA 2分子への外来遺伝子GFPの導入を試みた結果、CMVのRNA 2分子を改変した新規のCMVベクターの開発に成功し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、接種植物体において全身感染を示し、安定的に外来遺伝子を発現する機能を有する新規CMVベクターを提供することを目的とするものである。

また、本発明は、約1000種類以上の植物を宿主として、これらの植物におけるベクターとして好適に利用し得る新しい植物ウイルスベクターを提供することを目的とするものである。

更に、本発明は、導入された外来遺伝子を安定的に発現させることができるCMVベクター、及び該ベクターを利用した新しい植物遺伝子発現方法を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するための本発明は、以下の技術的手段から構成される。

(1) キュウリモザイクウイルス (Cucumber mosaic virus, CMV) の RNA 2 分子の 2 b 領域の一部を欠失させ、当該配列部分に外来遺伝子導入サイトを挿入したことを特徴とする植物ウイルスベクター。

(2) CMV-Y RNA 2 の感染性クローンである pCY2 の 2 b ORF の StuI サイトからストップコドンまでの領域を欠失させたことを特徴とする、前記 (1) に記載の植物ウイルスベクター。

(3) 2 b ORF の 8 番目の U (ウラシル) を A (アデニン) に変えるポイントミューテーションを導入したことを特徴とする、前記 (2) に記載の植物ウイルスベクター。

(4) pCY2 の StuI-AvrII 領域に、StuI-stop-MluI-SnaBI を含む領域を導入したことを特徴とする、前記 (2) に記載の植物ウイルスベクター。

(5) CMV が、CMV-Y、SSV、CMV-O、CMV-L、m2-CMV、HL-CMV に代表されるサブグループ 1 及びサブグループ 2 に属する CMV 分離株である、前記 (1) に記載の植物ウイルスベクター。

(6) 前記 (4) に記載の植物ウイルスベクターの StuI サイトと MluI 領域に、外来遺伝子を挿入したことを特徴とする遺伝子組み換え体。

(7) 前記 (6) に記載の遺伝子組み換え体を使用して外来遺伝子を植物に導入し、安定的に外来遺伝子を発現させることを特徴とする植物における遺伝子発現方法。

【0008】

【発明の実施の形態】

次に、本発明について更に詳細に説明する。

本発明は、キュウリモザイクウイルス (Cucumber mosaic virus, CMV) の RNA 1、RNA 2、RNA 3 A、及び RNA 3 B の 4 分節のウイルスゲノムの RNA 2 分子の 2 b 領域の一部を欠失させ、当該配列部分に外来遺伝子導入サイトを

挿入した新規CMVベクターに係るものである。本発明の植物ウイルスベクターとしては、後記する実施例に詳細に示されるように、例えば、CMV-Y RNA 2の感染性クローンであるpCY2の2b ORF内のStuIサイトからストップコドンまでの領域を欠失させたプラスミド（pCY2-2bΔStuと命名）が例示される。そして、その作出方法としては、具体的には、例えば、CMV-Y RNA 2の感染性クローンであるpCY2の2b ORF直後の3' 末端非翻訳領域を、後記する実施例に記載のプライマーY2b-Stuと3' 末端のプライマーCMV-DET-3-340でPCRをかけ、pCY2のStuI-AvrII領域に、StuI-stop-MluI-SnaBIを含む領域を導入する方法が例示される。

【0009】

CMV-Y RNA 2には、ウイルスの複数酵素複合体の一部である2のタンパク質とオーバーラップした形で2bタンパク質がコードされている。そのため、CMV-Y 2bタンパク質の非発現ウイルスを作出するために、2bタンパク質のORFにストップコドンを導入する。2bタンパク質のORFにストップコドンを導入する際には、2aタンパク質のアミノ酸置換が起こらないようにする必要がある。この条件をクリアーするために、例えば、2b ORFの8塩基目のU（ウラシル）をA（アデニン）に変えるポイントミューテーションを導入する方法が例示される。

【0010】

具体的には、ポイントミューテーションを導入する配列において、後記する実施例に記載のセンス及びアンチセンスのプライマーを作成し、それぞれ3'、5'のプライマーとともにPCRをかけて増幅し、それぞれのバンドを切り出して混合し、それをテンプレートとして、例えば、後記する実施例に記載の5'及び3'のプライマーでPCRをかけ、そのPCRフラグメントをHindIIIとBlnIで切断し、この断片をpUC119のHindIII-XbaI領域にクローニングする。pUC119-ポイントミューテーションからHindIII-StuI領域を切り出し、pCY2のHindIII-StuI領域に導入して、2b ORFにストップコドンになる点変異を導入したpCY2-2b s

top を構築する。

【0011】

これらの方法により、CMV-Y 2b タンパク質の C 末端欠失ウイルスベクターであって、同タンパク質の非発現ウイルスベクターを作出することができる。この改変ベクターは、植物への接種試験を行った結果、後記する実施例に示されるように、全身感染を示したが、CMV-Y ワイルドタイプに比べて、病徴の進行は遅いことが確認された。本発明では、上記 CMV-Y 改変ウイルスベクターの Stu I サイトと Mlu I 領域に外来遺伝子を導入し、これを植物体に感染させることで、植物において、外来遺伝子を安定的に発現させることができる。

【0012】

本発明の CMV ベクターは、例えば、green fluorescent protein (GFP) を組み込んだ PCY2-GFP からの RNA 転写産物接種第一代では安定的に GFP を発現させることができる。おそらく、RNA 2 分子に直接外来遺伝子を導入しているため、前記 4 分節 CMV ベクターでみられたような分節間での intermolecular recombination を起こさなかったことが、ベンタミアーナ上葉で GFP 発現に成功した要因であると考えられる。CMV-Y の代わりに、SSV (Soybean stunt virus, ダイズ萎縮ウイルス-CMV の 1 系統) の RNA を使用した場合においても、ベンタミアーナ上葉で GFP の発現が見られたことから、ダイズへの応用も十分に期待される。

【0013】

本発明のシステムにおいては、このテンプレートスイッチを起こさないために、例えば、GFP のアミノ酸を変えずに塩基を変えること、又は CMV-Y の 3' 末端の配列を他の CMV 系統、例えば、SSV や HL-CMV (ユリ系統) の 3' 末端に改変することなどの工夫を付加することができる。本発明のベクターとしては、好適には、例えば、CMV-Y RNA 2 3051 塩基において、2b の 3' 末端 71 塩基を欠失させた pCY2-2bΔStu (2980 塩基) が例示されるが、これに制限されるものではない。

【0014】

以上のように、従来、RNA ウイルスベクターの開発は、タバコモザイクウイ

ルスに代表されるように、棒状、ひも状のウイルスが使用されてきた。棒状、ひも状のウイルスベクターは、球状ウイルスに比べ挿入できる外来遺伝子の長さに物理的制限が少ないという利点がある。一方、本発明で用いたような球状ウイルスでは、その粒子形態からウイルスベクターとしての利用が困難であり、僅かに complementation による 4 分節 CMV ベクターの開発や RNA 3 に外来遺伝子を導入する方法をとられてきたが、いずれも接種上葉での増殖が認められない等の問題があった。そこで、本発明では、CMV の RNA 2 分子を改変した新規の CMV ベクターを開発した。CMV としては、CMV-Y、CMV-O、CMV-L、SSV、m2-CMV に代表される CMV サブグループ 1 及び 2 に属する CMV 分離株が利用可能である。

【0015】

本発明では、当該 CMV ベクターに、例えば、外来遺伝子として GFP 遺伝子を用い、宿主植物に *Nicotiana benthamiana* を用いて機能特性を解析した結果、接種植物体において全身感染を示し、安定的に GFP を発現させることが確認できたが、本発明は、これらに制限されるものではなく、例えば、トマト、タバコ、ホウレンソウ、ダイズ、キュウリ、ジャガイモ等の植物に代表される適宜の植物及び約 1000 bp 程度までの外来遺伝子に適用可能である。本発明は、約 1000 種類以上の植物を宿主とし、これらの植物においてベクターとして利用可能で、安定的に外来遺伝子を発現することが可能な新規 CMV ベクターを提供するものとして有用である。また、このベクターは、RNA 2 を改変したため、従来の CMV では観察されないサイレンシングを誘導することも可能であり、新規の特性を有するものとして有用である。

【0016】

【実施例】

次に、実施例に基づいて本発明を具体的に説明するが、本発明は、以下の実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例

(1) 供試ウイルス

供試ウイルスとして、CMV の 1 系統の CMV-Y を使用し、北海道大学大学

院農学研究科附属世代短縮温室（気温20～30℃、札幌自然日長）において、ベンタミアーナ (*Nicotiana benthamiana*)、もしくはタバコ (*N. tabacum*) で継代した。

【0017】

(2) 供試植物の育成

ベンタミアーナ及びタバコの育成を、以下の方法により行った。

4号鉢に播種用土(タキイソイル(タキイ種苗)シャベル4杯、三共培養土(三共)4杯、黒土1杯)を入れ、その上に一握りのバーミキュライト(昭和バーミキュライト株式会社・オートクレーブ済)を乗せ、十分に水を含ませ、種子を40粒程度播種した。ときどき、間引きをすることで植物体の生育ステージをそろえるようにして、北海道大学大学院農学研究科附属恒温恒湿温室(気温28℃、日照時間16時間)で育てた。2～3cm程度に生育したところで、移植用土(タキイソイル2杯、三共培養土3杯、黒土1杯、腐葉土(札幌イセキ販売)1杯)に2本ずつ移植した。移植後1週間は新聞紙をかぶせ日光を遮り、その後は植物体の成長に合わせて施肥した。

【0018】

(3) 接種試験

ベンタミアーナやタバコは、移植後1～2週間ほど経過し、本葉が3～5枚展開した個体がウイルスに対しての感受性が高く、接種に最も適している。

接種源としては、モザイクや縮葉などのウイルス病徴が見られるベンタミアーナの上葉を用いた。接種ステージに達した植物において接種する葉全体にカーボランダム(Nacalレーメッシュ600-乾熱済み)を薄くふりかけた。下記の0.1Mリン酸緩衝液(pH7.1)1mlに、DIECA(N,Nジエチルジチオカルバミド酸ナトリウム(Wako)、接種直前に添加)を終濃度10mMになるように加えて接種源となる感染葉0.1gとともに乳鉢で磨砕した。指サックに磨砕粗汁液をつけ、葉の表面に軽くなでるように塗布した。接種後すぐ水をかけて葉面から粗汁液とカーボランダムを洗い流し、翌日まで新聞紙で覆いをして遮光した。

0.1M リン酸緩衝液(pH7.1)は、0.2Mリン酸一ナトリウム溶液

(Nacalai) 33ml、0.2Mリン酸二ナトリウム溶液(Nacalai) 67mlを混合し、pH7.1に調製し、蒸留水でメスアップ、オートクレーブして200mlとした。

【0019】

(4) コンピテントセルの調製

下記のSOB液体培地2mlに大腸菌(*Escherichia coli*) JM109株(TaKaRa)を入れ、37℃で12~14時間振盪培養した。SOB液体培地50mlに前培養液を0.5ml接種し、37℃で約1時間半(OD550 = 0.4~0.8)振盪培養した。氷上に10分間静置した後ナルゲンチューブに移し、3500rpm、4℃、10分遠心した。上清を捨て、氷冷した下記のTFB17mlで穏やかに懸濁した。氷上で20分間静置した後、再び3500rpm、4℃で10分間遠心した。上清を捨て、氷冷したTFB2mlを加え、液面で沈殿を穏やかに懸濁した。氷上で30分間静置した後、DMSO(ジメチルスルフォキシド-Nacalai) 150 μ lを一滴ずつゆっくり加え、再度氷上で10分間静置した。先を切ったチップでエッペンドルフチューブに100 μ lずつ分注し、-80℃で保存した。

【0020】

SOB液体培地は、Bacto™ Tryptone (Becton Dickinson) 20g:Bacto™ Yeast Extract (Becton Dickinson) 5g:1M NaCl溶液10ml、1M KCl溶液2.5mlを混合し、蒸留水でメスアップし、1Lとした後、オートクレーブし、使用前に濾過滅菌した1M MgCl₂溶液(Nacalai)と1M MgSO₄溶液(Nacalai)を1/100量加えて調製した。

また、TFB(形質転換緩衝液)は、35mM酢酸カリウム(Nacalai)、50mM CaCl₂(Wako)、45mM MnCl₂(Nacalai)、100mM RbCl(Nacalai)、15% ショ糖(Wako)-酢酸(Wako)の組成でpH5.8に調整し、濾過滅菌して調製した。

【0021】

(5) 形質転換

緩やかに溶かしたコンピテントセル $100\mu\text{l}$ にプラスミド $1\mu\text{l}$ （ライゲーション反応液の場合 $5\mu\text{l}$ 程度）を加え、氷上で30分間静置して自然な拡散で混合させた。42℃のウォーターバスに45秒間入れ、すぐに氷冷し、大腸菌内にプラスミドを導入させた。下記の2YT液体培地0.9mlをチューブの壁につたわせながら加え、37℃で30分間静置培養した。その後、37℃で30分間振盪培養した。このうち $100\mu\text{l}$ を下記のLB-amp培地に広げた。ブルーホワイトセレクションをする場合には、あらかじめ2%X-gal（5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド（Wako）をN,N-ジメチルホルムアミド（Nacalai）で2%濃度に溶解） $50\mu\text{l}$ 、100mM IPTG（イソプロピル- β -D（-）-チオガラクトピラノシド溶液（Wako）一濾過滅菌） $10\mu\text{l}$ をLB培地上に塗布した後、大腸菌培養液 $100\mu\text{l}$ を広げた。12～16時間、37℃のインキュベーターで逆向きに培養した。

【0022】

2YT液体培地は、Bacto™ Tryptone 16g、Bacto™ Yeast Extract 10g、NaCl 10gを混合し、蒸留水でメスアップして1Lとし、オートクレーブして調製した。

また、LB-amp培地は、Bacto™ Tryptone 10g、Bacto™ Yeast Extract 5g、NaCl 10g、Agar（Wako）15gを混合し、蒸留水でメスアップして1Lとした後、オートクレーブし、50℃ぐらいに冷ましてから50mg/mlアンピシリンストック（Wako一濾過滅菌済み）を1/1000量加え、固まる前に滅菌シャーレに分注して調製した。

【0023】

（6）プラスミド抽出

濃度50mg/mlアンピシリンストック $2\mu\text{l}$ を加えた2YT液体培地2mlの中に、形質転換によって得られた大腸菌のコロニーを滅菌済み爪楊枝で拾い入れ、37℃で12～14時間振盪培養した。この培養液を1.5mlチューブに入れ、10000rpmで1分間遠心した。アスピレーターで上清を取り除き

、下記の Solution-1 を $200\mu\text{l}$ ずつ加え、チューブミキサーで完全に懸濁した。これに、下記に Solution-2 を $200\mu\text{l}$ ずつ加え、転倒混和した。次に、下記の Solution-3 を $200\mu\text{l}$ ずつ加え、再び転倒混和した。これを 14000rpm で 4°C 、10 分間遠心し、上清をとってチューブに移し、もう一度遠心 (14000rpm 5 分間) にかけて、タンパクを完全に除去した。上清を移し、回収した上清と同量のイソプロピルアルコール (Wako) を加え、転倒混和した。 14000rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てた。 80% エタノール (Nacalai) を $500\mu\text{l}$ 加え、 14000rpm 5 分間遠心し、上清を捨てた。RNase A を TE (10mM Tris-HCl ($\text{pH}7.5$)、 1mM EDTA ($\text{pH}8.0$)) で終濃度 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈して $100\mu\text{l}$ ずつ加え、軽くミキサーにかけ、 37°C で 30 分間静置した。これに、下記の Solution-4 を $60\mu\text{l}$ 加え、ボルテックスミキサーで攪拌して、氷上で 45 分間静置した。 14000rpm で 10 分間遠心し、上清を捨てた。 80% エタノールを $500\mu\text{l}$ 加え、 14000rpm 5 分間遠心した。上清を捨て、5~10 分間減圧乾燥し、滅菌水 $30\mu\text{l}$ で懸濁した。このプラスミドサンプルは -30°C で保存した。

【0024】

a) Solution-1:

25mM Tris (2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1, 3-プロパンジオール (Wako) -HCl ($\text{pH}8.0$)、 10mM EDTA (エチレンジアミン-N, N, N', N'-テトラアセティックアシッド/同仁化学)、 50mM グルコース (Wako)

b) Solution-2:

0.2N NaOH (Wako)、 1% SDS (ラウリル硫酸ナトリウム-Nacalai)

c) Solution-3:

5M 酢酸カリウム溶液 60ml 、酢酸 11.5ml 、蒸留水 28.5ml

d) Solution-4:

20% PEG#6000 (ポリエチレングリコール-Nacalai)、2.

5M NaCl

【0025】

(7) 基本的な遺伝子操作の方法

1) 制限酵素処理

各メーカーの制限酵素 $0.5 \mu\text{l}$ とその添付バッファーを使用し、 $20 \mu\text{l}$ の反応系で指定の温度下において1時間以上静置した。

2) 電気泳動

目的のDNAの長さに適した濃度のTBE (89 mM Tris-base 、 89 mM 硼酸 (Wako)、 2 mM EDTA) アガロース (Gene pure (登録商標) LE AGAROSE-BM) ゲルを用い、TBEを泳動緩衝液として泳動を行なった。泳動後、エチジウムブロマイド溶液 (終濃度 $0.5 \mu\text{g/ml}$) で染色した。

【0026】

3) フェノールクロロホルム抽出

サンプルDNA液に滅菌水を加え $100 \mu\text{l}$ にし、 $50 \mu\text{l}$ のTE飽和フェノール (ニッポンジーン) と $50 \mu\text{l}$ のクロロホルム (Wako) を加え、チューブミキサーにかけて1~2分攪拌してタンパクを失活させた。 14000 rpm で5分間遠心し、 1.5 ml チューブに水層だけに移した。クロロホルムを $100 \mu\text{l}$ 加え、ボルテックスミキサーにかけ、 14000 rpm 5分間遠心した。 1.5 ml チューブに水層だけを取りわけた。

【0027】

4) エタノール沈殿

サンプルDNA液 $100 \mu\text{l}$ に 3 M 酢酸ナトリウム (ニッポンジーン) $10 \mu\text{l}$ 、 100% エタノール $330 \mu\text{l}$ 、エタチンメート (ニッポンジーン) $1 \mu\text{l}$ を加えて攪拌して、 14000 rpm 10分間遠心し、上清を取り除いた。 $500 \mu\text{l}$ の 80% エタノールを加え、 14000 rpm 2~3分間遠心した。上清を取り除き、減圧風乾した。

【0028】

5) クローニング

ゲルからDNAを回収する場合、SeaKem（登録商標）GTC（登録商標）agarose（BMA）を使い、直接EtBrを終濃度 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ で入れたアガロースゲルを使用し電気泳動を行った。目的のバンドを含むゲル片を切り出しQIAEX（登録商標）II Gel Extraction kit 150（QIAGEN）でDNAを回収した。回収したDNA溶液をフェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿した後、 $5\mu\text{l}$ の滅菌水に懸濁した。ベクターとインサートのライゲーションには、DNA Ligation Kit Ver. 2（TaKaRa）を使用した。回収したDNA溶液と等量のVer. 2-I液を加えて懸濁した。 16°C で30分間静置した後、ライゲーション反応液半量をE. coliのコンピテントセルに形質転換した。

【0029】

(8) 感染性クローンのin vitro 転写

アルカリ-SDS法で抽出した感染性クローン $4\mu\text{l}$ をrun-off転写に用いる制限酵素で線状化し、フェノールクロロホルム抽出、エタノール沈殿をした後、得られたペレットを $9\mu\text{l}$ の滅菌水に懸濁した。転写反応液を以下のように混合した。

【0030】

(転写反応液)

テンプレート溶液	$9\mu\text{l}$
0.1M DTT	$5\mu\text{l}$
10×T7 RNA polymerase Buffer*11	$2\mu\text{l}$
10mM $\text{m}^7\text{G}(5')\text{ppp}(5')\text{G}$ RNA Capping Analog (Invitrogen)	$2\mu\text{l}$
20×NTP 混合液*12	$1\mu\text{l}$
RNase inhibitor*13	$0.5\mu\text{l}$
T7 RNA polymerase	$0.5\mu\text{l}$
*11・・・T7 RNA polymerase (TaKaRa) に添付	
*12・・・20×NTP (1mM ATP、1mM CTP、1mM UTP)	

、0.1mM GTP-Roche)

*13...Ribonuclease Inhibitor, recombinant, soln (Wako)

【0031】

37℃で1時間静置した。T7 RNA polymerase 0.5 μ lを転写反応液に再び加えて、更に37℃で1時間静置した。すぐに接種しない場合、転写産物は-80℃で保存した。転写産物(RNA 1・2・3)をそれぞれ15 μ lずつと0.1Mリン酸緩衝液(pH7.1)30 μ lを混合した。ベンタミアーナ1本あたり12.5 μ lずつの転写接種液を、通常のウイルス接種と同様に、カーボランダムと指サックで接種した。

【0032】

(9) RNA抽出

(フェノール-SDS法)

RNA抽出バッファー500 μ lとTE飽和フェノール500 μ lで試料(又はプロトプラスト)0.1gを磨碎して、1.5mlチューブに移した。20秒ほどボルテックスミキサーにかけ、14000rpmで5分間冷却遠心した。上清(水層)を別のチューブに移し、上清と等量のフェノールクロロホルム(1:1)を加え、ボルテックスミキサーにかけて激しく攪拌した後、14000rpmで5分間冷却遠心した。上清を別のチューブに移し、白いタンパクの層がなくなるまでくりかえし、フェノールクロロホルム抽出を行った。最後に等量のクロロホルムでリンスした後、水層をとりわけ、1/10量の3M酢酸ナトリウム、3倍量の100%エタノールを加えた。ボルテックスをかけ、14000rpmで5分間冷却遠心した。上清を捨て、80%エタノール500 μ lを加え、14000rpmで5分間冷却遠心した。5~10分間減圧乾燥後、RNA用滅菌水50 μ l(プロトプラストの場合10 μ l)で懸濁し、14000rpmで1分間ほど遠心した。沈殿があった場合は、上清だけを別のチューブに移しかえた。RNA抽出バッファーは、25mM Tris-HCl(pH7.5)、25mM MgCl₂、25mM KCl、1% SDSの組成である。

【0033】

(10) RT-PCR

1) 逆転写反応

以下に示す反応溶液を調製した。

RNase Free dH ₂ O ^{*15}	7.5 μ l
25mM MgCl ₂ ^{*15}	4 μ l
each 10mM dNTP Mixture ^{*15}	2 μ l
10 \times RNA PCR Buffer ^{*15}	2 μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l
3' プライマー	1 μ l
サンプルRNA	2 μ l
AMV Reverse Transcriptase XL (TaKaRa)	0.5 μ l

*15・・・RNA PCRTM kit (AMV) Ver. 2.1 (TaKaRa) に添付

これを、45℃で1時間静置した。その後、逆転写酵素を不活性化するため、これを、5分間ボイルし、5分間急冷した。

【0034】

2) PCR反応

以下のようなPCRミックスを調製した。

滅菌水	63.5 μ l
25mM MgCl ₂ ^{*16}	6 μ l
10 \times LA PCR TM BufferII (Mg ²⁺ free) ^{*16}	8 μ l
5' プライマー	1 μ l
3' プライマー	1 μ l

*16・・・TaKaRa LA TaqTMに添付

これに、逆転写反応液20 μ lを加え、更に、TaKaRa LA TaqTM 0.5 μ lを加え、PCRを行った。PCR産物を1%アガロースゲルで電気泳動し、目的の断片が増幅されているのを確認した。

【0035】

(11) シークエンス

アルカリ-SDS法で抽出したサンプル1 μ lに蒸留水1.5 μ lを加え、テンプレートDNA溶液とした。M13プライマー (IRD800 Infrared Dye Labeled Primer-M13 Forward (-29) /IRD800, M13 Reverse /IRD800-日清紡) 0.25 μ lにACGT各基質溶液(Thermo sequence fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP(amersham pharmacia))を加え、4種類のプライマー基質混合溶液とした。8連PCRチューブにテンプレートDNA溶液2.5 μ l、プライマー基質混合溶液1.25 μ lを分注し、下の条件でPCRをかけた。

【0036】

(PCRの条件)

95℃	5分	1サイクル
95℃	30秒	
50℃	30秒	30サイクル
70℃	1分	
10℃	∞	

【0037】

PCR反応後、2 μ lのloading dye fluorescent samples-Stop solution (Amersham)を加えた。シークエンスゲル溶液を0.2 μ mメンブレンでろ過した後、30分程度脱気をした。ゲル溶液に400 μ lの10%APS (ペルオキシニ硫酸アンモニウム (Nacalai))と40 μ lのTEMED (N, N, N', N', -Tetramethylethylenediamine (Nacalai))を加え、すぐにゲル板に流し込んだ。コームを差し、水平なところに置いた。30分後、ゲル板の両端に水で濡らしたJKワイパー (クレシア)とともにラップで包み、5時間以上静置した。Licor Sequencerにゲル板をセットし、1Lの1×TBEを所定の位置に注ぎ、1.8 μ lのPCRサンプルを各ウェルに注入した。24時間程度泳動を行なった。

シークエンスゲル溶液は、尿素 (Nacalai) 25.2g、10×TBE 7.2ml、Long Ranger (登録商標) gel solution (BMA) 4.8mlを混合し、蒸留水でメスアップして60mlとした。

【0038】

(12) GFP蛍光の検出

感染して病徴をあらわしている接種葉及び上葉を、暗室内において実体顕微鏡下 (SZX-12, OLYMPUS) でGFP蛍光を検出した。

【0039】

(13) CMV-Y 2bタンパク質のC末端欠失ウイルスの作出

CMV-Y RNA2の感染性クローンであるpCY2の2b ORF直後の3'末端非翻訳領域を、下記のプライマーY2b-Stuと3'末端のプライマーのCMV-DET-3-340でPCRをかけ、PCR産物のStuI-AvrII領域をpCY2のStuI-AvrII領域に導入した。

(プライマー)

Y2b-Stu: CGAGGCCTGACGCGTGTACGTAAACCTCCCCTTCCGCATC

CMV-DET-3-340: CCATCGATTGGTCTCCTTTTGGAGGCC

CMV-Y RNA2の感染性クローンであるpCY2の2b ORF内のStuIサイトからストップコドンまでの領域を欠失させたプラスミド (pCY2-2bΔStu) を作出した。図1に、pCY2-2bΔStuの構築図を示す。

【0040】

このpCY2-2bΔStuをin vitro translationし、pCY1、pCY3の転写産物とともに、ベンタミアーナ、タバコに接種試験を行なった。その結果を表1に示す。Y1 Y2bΔStu Y3は、ベンタミアーナでは上葉に激しいモザイクが見られたが、激しいモザイクを起こし、枯死するCMV-Yワイルドタイプに比べると病徴の進行は遅かった。また、タバコにおいても上葉にモザイク病徴が見られ、全身感染を示したが、ベンタミアーナと同様にCMV-Yに比べて病徴の進行は遅かった。

【0041】

【表1】

CMV-Y 2b 改変ウイルスのベンタミアーナ、
タバコにおける接種試験、病徴の程度比較

Y1-Y2b ΔStu-Y3	+(M)	+(CS)	+(M)
Y1-Y2bstop-Y3	+(M)	+(CS)	+(M)
CMV-Y	+++ (M)	+++ (CS)	+++ (M)

接種ウイルス	ベンタミアーナ 上葉	タバコ	
		接種葉	上葉

M: Mosaic, CS: Chlorotic spot

【0042】

(14) CMV-Y 2b タンパク質の非発現ウイルスの作出

CMV-Y RNA 2 には、ウイルスの複製酵素複合体の一部である 2a タンパク質とオーバーラップした形で 2b タンパク質がコードされている。そのため、2b タンパク質の ORF にストップコドンを導入する際には、2a タンパク質のアミノ酸置換が起こらないように考慮しなければならない。この条件をクリアするために、2b ORF の 8 塩基目の U (ウラシル) を A (アデニン) に変えるポイントミューテーションを導入した。このポイントミューテーションは、2a ORF のアミノ酸置換を起こさない。図 2 に、ポイントミューテーションを導入するストラテジーを示す。

【0043】

即ち、point mutation を導入する配列において、下記のセンス及びアンチセンスのプライマーを作成し、それぞれ 3' 及び 5' のプライマーとともに PCR をかけて Fragment I (lane 1) ・ II (lane 2) を

増幅した。それぞれのバンドを切り出して混合し、それをテンプレートとして5' 及び3' のプライマー (CY2T7・CMV-DET-3-340) でPCR をかけた (lane 3)。lane 3のPCR FragmentをHindIIIとBlnIで切断する (lane 4) とpCY2 (lane 5) と同位置に断片が見られた。このバンドを切り出し、pUC119のHindIII-XbaI領域にクローニングした。point mutationが正確に導入されているかどうかをシーケンスして変異していることを確認した。pUC119-point mutationからHindIII-StuI領域を切り出し、pCY2のHindIII-StuI領域に導入した。構築したpCY2-2bstopについてもpoint mutationが正確に導入されていることをシーケンスして確認した。

【0044】

(プライマー)

CY2T7: CCGGATCCATTAATACGACTCACTATAGTTTATTTACAAAGAGCG

2b-5-stop: AGAAATATGGAATAGAACGTAGG

2b-3-stop: CCTACGTTCTATTCATATTTCT

pCY1、pCY3の転写産物とともに接種試験をしたところ、ベントミアーナ、タバコにおいて全身感染を示したがワイルドタイプに比べ病徴の進行は遅かった (表1)。

【0045】

(15) CMV-Y RNA 2への外来遺伝子GFPの導入

CMV-Y 2bタンパク質のC末端を欠失させたpCY2-2bΔStuをin vitroで転写し、別に転写したY1とY3を混合して接種した時には、ベントミアーナ及びタバコに全身感染した。そこで、2bを欠失させた位置に外来DNAを組み込めるpCY2-2bΔStuをウイルスベクターとすることを目的として、pCY2-2bΔStuのStuIサイトとMluI領域にGFPの配列を挿入した。図3に、CMV-Y RNA 2への外来遺伝子 (GFP) の導入のプロセスを示す。pC3-S65T-GFPをテンプレートとしてPCRを行い、GFP ORFの5' にStuIサイトを、3' にMluIサイトを

付加した。次に、pCY2-2bΔStuのStuI-MluI領域にGFP断片をクローニングし、pCY2-2bΔStu-GFPを構築した。このGFPの配列を挿入したプラスミドpCY2-2bΔStu-GFPを*in vitro*転写し、pCY1、pCY3のRNA転写産物とともにベンタミアーナ、タバコに接種し、接種2日後の接種葉及び5日後の上葉のGFP蛍光を観察した。図4に、Y1Y2-GFPY3（RNA転写産物）のベンタミアーナ、タバコでのGFP蛍光の検出結果を示す。

【0046】

(16) 結果

接種後2日目の接種葉及び5日目の上葉のGFP蛍光を観察した結果、接種葉ではウイルスの感染点にあたる場所にGFP蛍光が見られ、上葉では病徴と同じように葉全体に非常に強いGFP蛍光が広がって見られた。

【0047】

【発明の効果】

以上詳述したように、本発明は、CMVのRNA2分子を改変した新規のCMVベクター等に係るものであり、本発明により、(1)新しい植物RNAウイルスベクターを提供できる、(2)該ベクターは、接種植物において全身感染を示し、安定的に外来遺伝子を発現させることができる、(3)また、このベクターは、約1000種類以上の植物を宿主とし、これらの植物においてベクターとして利用可能である、(4)新しい植物遺伝子発現方法を提供できる、(5)この方法は、植物に外来遺伝子を導入し、これを安定して発現させる新しい植物遺伝子発現方法として有用である、(6)複製能が高く、ジーンサイレンシングによる遺伝子発現阻止に有効である、等の効果を奏する。

【0048】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology;
Chikara Masuta; Hokkaido Green-Bio Institute

<120> Plant Virus Vector

<130> 341H03002

<141> 2003-06-27

<160> 4

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<223> Designed base sequence to act as a primer

<400> 1

cgaggcctga cgcggtgtacg taaacctccc ctccgcac

40

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

ccatcgattg gtctcctttt ggaggcc

27

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3.

ccgatccat taatacgact cactatagtt tatttcaaaa gagcg

45

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

agaaatatgg aatagaacgt agg

23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

cctacgttct attccatatt tct

23

【図面の簡単な説明】

【図 1】

pCY2-2bΔStuの構築図を示す。

【図 2】

pCY2-2bstopの構築を示す。

【図 3】

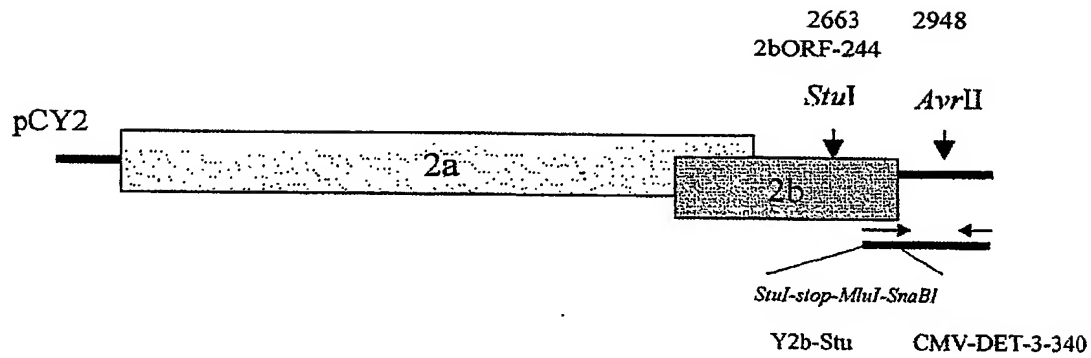
CMV-YRNA2への外来遺伝子（GFP）の導入を示す。

【図 4】

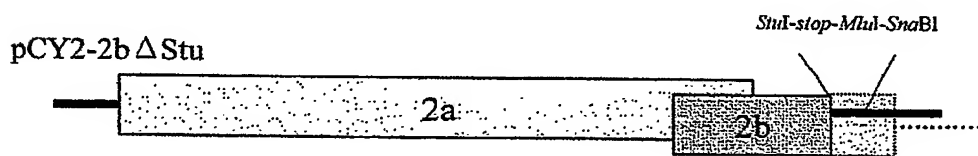
Y 1 Y 2 - G F P Y 3 (RNA 転写産物) のベンタミアーナ、タバコでの G F P 蛍光の検出を示す。

【書類名】 図面

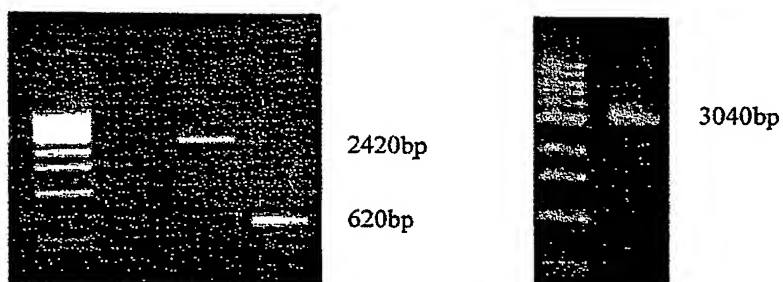
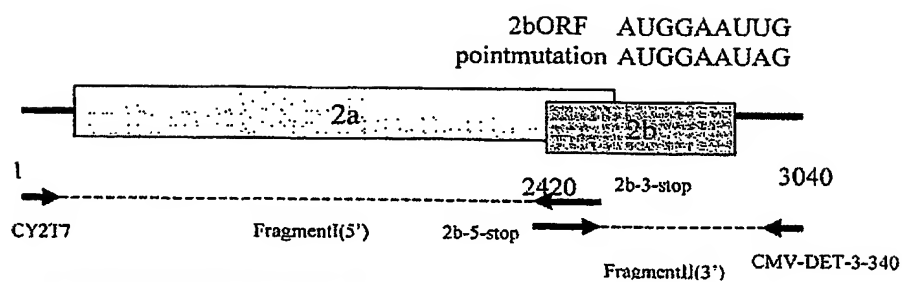
【図 1】



Y2b-Stu	CGAGGCCTGACGCGTGTACGTAAACCTCCCCTTCCGCATC <i>StuI</i> stop <i>MluI</i> <i>SnaBI</i> CMV-Y 2753?
CMV-DET-3-340	CCATCGATTGGTCTCCTTTTGGAGGCC



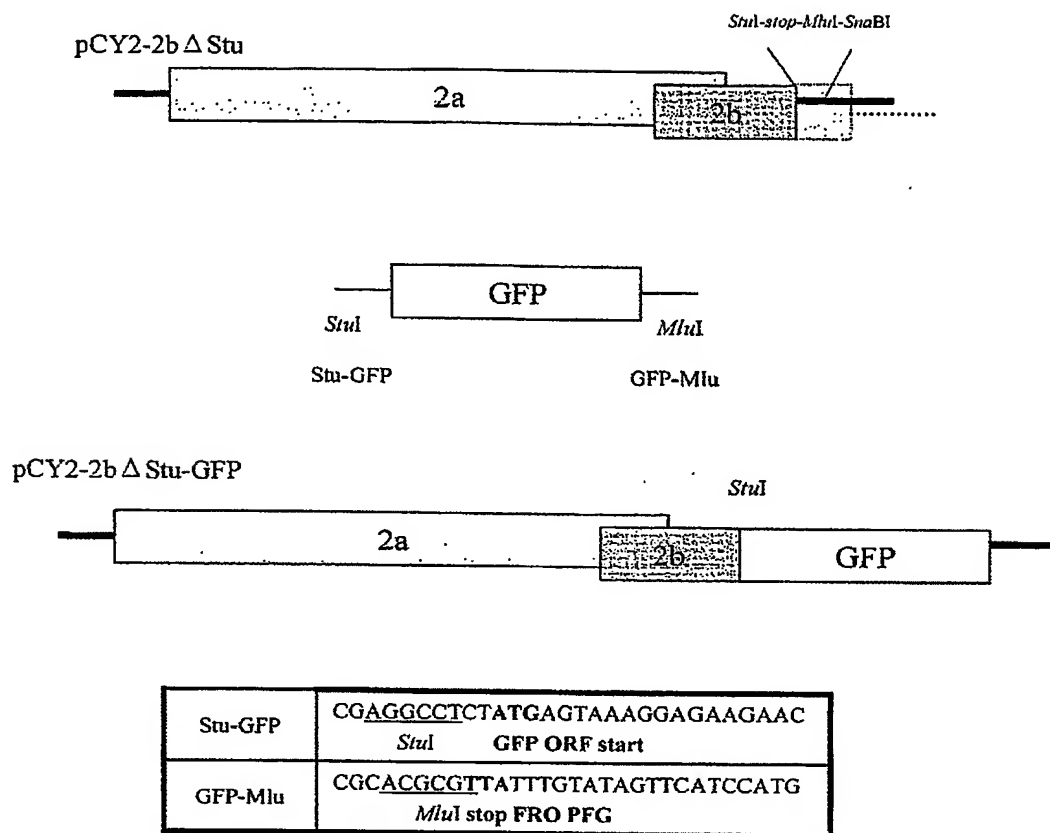
【図 2】



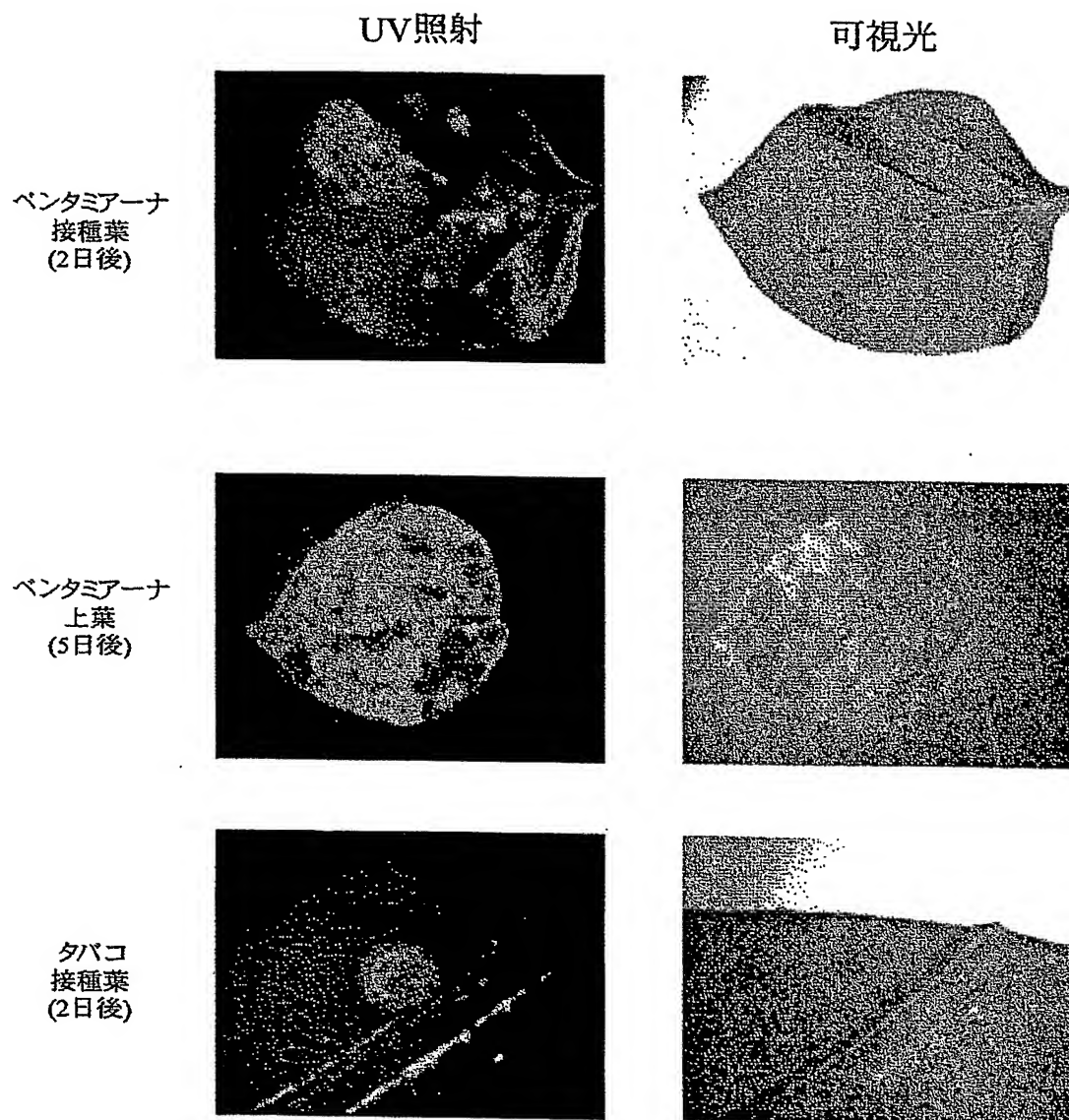
Lane4:pointmutation-PCR/*Hind*III-*Bln*I処理
Lane5:pCY2/*Hind*III-*Bln*I処理
Lane6:pUC119/*Hind*III-*Xba*I処理

CY2T7	CCGGATCCATTAATACGACTCACTATAGTTTATTACAAAGAGCG
2b-5-stop	AGAAATATGGAATAGAACGTAGG
2b-3-stop	CCTACGTTCTATTCCATATTCT

【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規植物ウイルスベクター及び植物の遺伝子発現方法を提供する。

【解決手段】 キュウリモザイクウイルス (Cucumber mosaic virus, CMV) の RNA 2 分子の 2 b 領域の一部を欠失させたことを特徴とする植物ウイルスベクター、CMV-Y RNA 2 の感染性クローンである pCY2 の 2 b ORF の Stu I サイトからストップコドンまでの領域を欠失させたことを特徴とする前記植物ウイルスベクター、及び前記遺伝子組み換え体を使用して外来遺伝子を植物に導入し、安定的に外来遺伝子を発現させることを特徴とする植物における遺伝子発現方法。

【効果】 安定的に外来遺伝子を発現させる植物 RNA ベクターとして有用である。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 1 8 5 9 8 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 4 月 2 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1
氏 名	独立行政法人産業技術総合研究所

特願 2 0 0 3 - 1 8 5 9 8 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 2 1 1 3 5 0 0]

1. 変更年月日 1 9 9 2 年 4 月 3 0 日

[変更理由] 新規登録

住 所 北海道夕張郡長沼町東 5 線北 1 5 番地

氏 名 株式会社北海道グリーンバイオ研究所

特願 2 0 0 3 - 1 8 5 9 8 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 2 3 4 9 5 3]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 6 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

北海道札幌市北区北 9 条西 9 丁目 北海道大学大学院 農学研
究科内

氏 名

増田 税